

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 02-072874 (JP, 5-22510, B2)
(43)Date of publication of application : 13.03.1990

(51)Int.Cl. C12N 9/08

(21)Application number : 63-222516 (71)Applicant : KOKEN CO LTD
(22)Date of filing : 07.09.1988 (72)Inventor : ASO TAKESHI
ODA KADOAKI
SAKOTA NAOICHI

(54) PRODUCTION OF RICE HULL PEROXIDASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To inexpensively produce a rice hull peroxidase in simple operation by adding a specific amount of water to rice hulls, crushing the rice hulls, separating a crude enzyme liquid by centrifugation, concentrating the enzyme by ultrafiltration and depositing and separating a protein of different kind by an organic solvent.

CONSTITUTION: 1-10pts.wt. water is added to 1pts.wt. rice hulls and the rice hulls are crushed and then a crude enzyme liquid is separated by centrifugation and concentrated by ultrafiltration and a protein of different kind other than the peroxidase is deposited and separated by an organic solvent and filtered to provide the rice hull peroxidase.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 特 許 公 報 (B 2)

平5-22510

⑪ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公告 平成5年(1993)3月29日

C 12 N 9/08

7823-4B

請求項の数 1 (全5頁)

⑬ 発明の名称 イネモミガラパーオキシダーゼの製造方法

⑮ 特 願 昭63-222516

⑯ 公 開 平2-72874

⑰ 出 願 昭63(1988)9月7日

⑱ 平2(1990)3月13日

⑲ 発 明 者 阿 藤 雄 山形県鶴岡市宝田1丁目18番36号 株式会社高研鶴岡工場内

⑲ 発 明 者 小 田 圭 昭 山形県鶴岡市家中新町9番14号

⑲ 発 明 者 迫 田 直 一 兵庫県神戸市東灘区住吉本町1丁目23番24号

⑲ 出 願 人 株 式 会 社 高 研 東京都新宿区下落合3丁目5番18号

⑲ 代 理 人 弁 理 士 田 中 宏

審 査 官 平 田 和 男

1

2

⑳ 特許請求の範囲

1 イネモミガラ1重量部に対し、1~10倍重量部の水を添加し、イネモミガラを水中で破碎し、その後遠心分離によつて粗酵素液を分離し、次いで、得られた粗酵素液を限外濾過によつて濃縮した後、有機溶剤を用いてパーオキシダーゼ以外の大部分の蛋白質を析出、分離した後、濾別することからなるパーオキシダーゼの製造方法。

発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、イネモミガラより簡単な操作によつて純化パーオキシダーゼを製造する方法に関する。

(従来の技術)

パーオキシダーゼは過酸化剤、例えば過酸化水素の共存下で種々の供与体の酸化反応を触媒する酵素であり、動物或は植物に由来する各種のパーオキシダーゼ及び微生物産生のパーオキシダーゼ等が知られている。特に西洋わさびのパーオキシダーゼは古くから知られている。パーオキシダーゼは過酸化水素を生成する酸化酵素と組合せて糖類、アミノ酸、有機塩基、コレステロール、ポリアミン等の微量定量に利用されており、又、抗原或は抗体の標識用酵素など広範囲の分野にわたつて利用されている。

このような広範囲に利用できるパーオキシダーゼがイネモミガラ中に存在することは、1970年、安江らによつて指摘されている(Rep. Takai Br. Crop Sci. Soc. Japan、第59巻、第6頁)。そして、イネモミガラからパーオキシダーゼを抽出する方法としては、イネモミガラを0.05~0.1モル濃度のリン酸緩衝液中で微粉化する方法が用いられている。しかし、イネモミガラは多量のシリカを含有し、堅固な構造を有するため、これを微粉化することは機械的にも多大な困難を伴うばかりでなく、エネルギー的にも経済的な製造法とはいえない。

更に、リン酸緩衝液を使用して抽出した粗酵素液には多量の異種蛋白質が含有されているため、有機溶剤分画、硫酸分画、透析、カラム処理等の複雑な処理行程を反復して行なうことが必要であつて、極めて操作が煩雑であり、且つ得られる酵素の収量も決して好ましいものではなかつた。

(発明が解決しようとする課題)

20 このような欠点を解決し、イネモミガラより簡単な操作でパーオキシダーゼを安価に製造する方法を種々検討した結果、0.05~0.1モル濃度のリン酸緩衝液の代わりに水を使用し、水中で破碎して抽出実験を行なつたところ、極めて容易にパー
25 オキシダーゼを抽出できることを見出して本発明

を完成するに至ったもので、本発明の目的はイネモミガラより簡単な操作によりパーオキシダーゼを抽出する方法を提供するにある。

(課題を解決するための手段)

すなわち、本発明は、イネモミガラ1重量部に
5 対し、1~10倍重量部の水を添加し、イネモミガラを水中で破碎し、その後遠心分離によつて粗酵素液を分離し、次いで、得られた粗酵素液を限外濾過によつて濃縮した後、有機溶剤を用いてパーオキシダーゼ以外の大部分の蛋白質を析出し、分
10 離した後、濾別することからなるパーオキシダーゼを製造する方法である。

更に、本発明について詳細に述べる。

本発明において使用する水とは、蒸留水、イオン交換水はもとより、いかなる水であつてもよく、例えば水道水であつてもよい。

そして、その水の使用量はイネモミガラ1重量部に対し1~10倍重量部、好ましくは、2~7倍重量部である。

この点について、イネモミガラの水中での破碎
20 によるパーオキシダーゼの抽出量を調べたところ、第1図のような結果が得られた。すなわち、第1図は、モミガラに対する抽出水量(重量倍)と抽出された酵素の収率(%)と比活性との関係を示した図である。この図より水量が1~2倍量
25 では遠心分離によつて得られる粗酵素液量が使用水量に対し比較的少量になるため酵素収率が少ない。ただ、実際には、遠心分離後、さらに水洗いを行なうことで酵素収率は向上させることができるが、破碎器内での発熱を考えると、抽出水量としてはモミガラの2倍程度がその下限と考えられる。また、抽出水量を増加させることは、異種蛋白質の抽出を促進することになり、抽出されたパーオキシダーゼの比活性(U/mg蛋白質)を低下することとなる。これらの事情を考慮すると、水の
30 使用量はイネモミガラ1重量部に対し1~10倍重量部、好ましくは2~7倍重量部が適当である。

次に本発明における特徴の一つは破碎することである。すなわち、破碎とは、必ずしも微粉碎を必要とせず、モミガラの外皮と内層の蛋白質とを
40 適当なズリ応力を加えることによつて剥離される程度に粉碎することで、外皮を剥離させることによつて水易溶性のパーオキシダーゼは、他の蛋白質に先がけて容易に水によつて抽出される。使用す

る粉碎機としては、特に限定はないが、マイクロカッター(ステフアン社製)、マスコロイダー(増幸産業製)などが好ましい。なお、破碎回数については、モミガラに対し、3倍重量の水を用い、
5 ミクロカッターでの破碎を反復したところ、3回の破碎で含有全活性の90%が抽出されることが解つた。しかしながら、工業的抽出にあつては、モミガラを1回破碎した後、分液し、更に、水洗することによつて抽出目的を達することができる。

かくして得られた抽出酵素液を限外濾過によつて約1/10まで濃縮して得られる粗酵素溶液は、約
10 $1.75 \times 10^4 \sim 1.88 \times 10^5$ U/mgの比活性を有しており、これは従来の多量のリン酸緩衝液を用いる抽出液の比活性約 0.7×10^4 U/mgと比較して2.5倍
15 ~25倍の比活性を有することになるが、なお多量の異種蛋白質を含有しているから、該酵素の工業的使用に対してもなお精製を必要とするものである。

次に、本発明においては、有機溶剤を使用して粗酵素溶液よりパーオキシダーゼ以外の異種蛋白質を分離、除去する。本発明において使用する有機溶剤は通常溶剤として使用されている有機溶剤であればよく、例えば、メタノール、エタノール、アセトン、イソプロパノール等があるが、特
25 に、イソプロパノールが好ましい。

従来のパーオキシダーゼの精製法の基本は、粗酵素液のアセトン分画、硫酸分画操作であるが、前者は、夏期における操業の危険性から、又後者は透析を必要とすることから何れも工業的製造法としては適当でないと思われる。

本発明者らは、イネモミガラパーオキシダーゼがイソプロパノールに対して極めて安定であり、室温であれば70%イソプロパノール水溶液中に数日間放置してもほとんど活性を失わないことから、イソプロパノールを使用することを試みた。
35 そして、イソプロパノールの濃度が30~40%のときパーオキシダーゼと異種蛋白質を分離するのに適していることを見出した。

次に、イソプロパノールを使用した抽出方法を述べる。すなわち、イネモミガラを水中で破碎、遠心分離によつて得られた粗酵素液を限外濾過によつて濃縮した液に、イソプロパノールの濃度が30~40%になるようにイソプロパノールを加え、パーオキシダーゼ以外の大部分の蛋白質を析出、

分離させた後、イソプロパノール濃度を60~80%にして沈殿する酵素を遠心分離してパーオキシダーゼを濾別するのである。この際の抽出温度としては、常温付近以下であれば良く、特に冷却する必要はない。

次に、イソプロパノールの濃度と沈殿中にみられるパーオキシダーゼ相対活性及び蛋白質収率との関係を第2図に示す。この第2図に見られるように、該酵素がイソプロパノール30~40%濃度まではほとんど沈殿しないのに対し、異種蛋白質は、その約50%が、このイソプロパノール濃度までに沈殿することを見出した。従つて、30~40%イソプロパノール濃度までに沈殿する蛋白質を濾別又は遠心分離によつて除去した後、イソプロパノール濃度を60~80%にして得た沈殿中に存在する酵素は、 $4.3 \times 10^4 \sim 4.62 \times 10^5 \text{ U/mg}$ の比活性を有することに至る。この値は、イソプロパノール処理を施す前の粗酵素液に対し2.5倍の比活性を有することとなり、冷蔵によつて極めて長期の保存に耐えることからそのままでも効率的使用に供することのできるパーオキシダーゼが得られたことになる。この酵素溶液は、更に精製、真空乾燥することによつて、純化酵素粉末として使用することも可能である。

以下、実施例によつて酵素の製造法を説明するが、本発明はその要旨を逸脱しないかぎり、以下の実施例に何ら限定されるものではない。

実施例 1

モミガラ1kgに対して3ℓのイオン交換水を加えミクロカッターによつて粗砕した後、遠心分離機(1800G)によつて約2.4ℓの粗酵素液が得られる。

遠心残渣に対して再び3ℓのイオン交換水を加えて同様の工程を行なつて、約2.7ℓの粗酵素液が得られた。上記の粗酵素液約5.1ℓをホロフアイバー型(旭化成製ACL-1010、分画分子量13000)の限外濾過を用いて約500mlに濃縮し、これにイソプロパノールを攪拌しながら330ml加えて1時間放置する。このときイソプロパノールの濃度は約40%となる。

次に、この粗酵素-イソプロパノール混液を遠心分離(10000G 10分)、またはガラス繊維濾紙で不溶残渣を除去し、得られた上澄又は濾液に対しさらにイソプロパノールを攪拌しながら840ml

加え、70%イソプロパノール濃度にして24時間室温放置する。このものを10000Gで10分間遠心分離することによつて沈殿を分取する。この沈殿を減圧乾固してパーオキシダーゼ標品とする。

5 実施例 2

実施例1と同様の方法でイソプロパノール40%濃度で不溶残渣を除去した粗酵素のイソプロパノール溶液に、更にイソプロパノールを攪拌しながら840mlを加え、70%イソプロパノール濃度にして24時間、冷蔵放置(2~5℃)する。

このものを遠心分離(1000G 10分)によつて分取した酵素沈殿を減圧乾固してパーオキシダーゼ標品とする。

実施例 3

15 実施例1と同様の方法でイソプロパノール40%で不溶残渣を除去した粗酵素のイソプロパノール溶液に、更にイソプロパノールを攪拌しながら840mlを加え、70%イソプロパノール濃度にして24時間、冷蔵放置(-10~-15℃)し、遠心分離(10000G 10分)して得た沈殿を減圧乾固してパーオキシダーゼ標品とする。

実施例 4

25 実施例1と同様の方法でイソプロパノール40%濃度で不溶残渣を除去した粗酵素のイソプロパノール溶液をロータリーエバポレーターにてイソプロパノールを減圧除去し、1mMのリン酸緩衝液で平衡化したDEAEセルロースのカラムを通過させる。

30 この操作で、酵素は吸着されずに通過するが、不純蛋白は吸着される。ここで得られた活性分画をホロフアイバー型限外濾過器にて脱塩濃縮した後、凍結乾燥してパーオキシダーゼ標品とする。

35 実施例1~3の活性収率の増加は、70%イソプロパノールの存在下での酵素析出温度の差によるものである。

実施例 5

40 モミガラ1kgに対して3ℓのイオン交換水を加えマスコロイダーによつて破碎した後、遠心分離機(1800G)によつて約2.4ℓの粗酵素液が得られる。この粗酵素液をホロフアイバー型限外濾過器を用いて約200mlに濃縮し、これにイソプロパノールを攪拌しながら、133ml加えて、40%イソプロパノール濃度にし、1時間冷蔵放置(2~5℃)する。次に、この粗酵素-イソプロパノール

混液を遠心分離 (10000G 10分)、又は、ガラス繊維燭紙を用いて不溶残渣を除去し、ここで得た上清又は濾液に対してさらにイソプロパノールを攪拌しながら、334ml加え、70%イソプロパノール濃度にして24時間冷蔵放置 (2~5℃) する。このものを10000Gで10分間遠心分離することによって沈澱を分散する。この沈澱を減圧乾固してパーオキシダーゼ標品とする。

実施例 6

実施例 5 と同様の操作によって得た70%イソプロパノール沈澱を1mMリン酸緩衝液に溶解し、上記緩衝液で平衡化したDEAEセルロースカラムを通過させる。ここで得られた活性画分をホロフアイパー型限外濾過器にて脱塩濃縮した後、凍結乾燥してパーオキシダーゼ標品とする。

これらのパーオキシダーゼ標品の収量、並びに粗酵素液に対する活性収率及び精製倍率を第1表に示した。

第 1 表

パーオキシダーゼ 標品	精製倍率 * 1	活性収率 * 2	酵素収量	酵素析出温度
実施例 1	4.32倍	39.6%	156.5mg	20℃
実施例 2	5.10倍	51.4%	171.3mg	2~5℃
実施例 3	5.35倍	60.8%	192.9mg	-10~-15℃
実施例 4	56.5倍	11.0%	5.5mg	20℃

パーオキシダーゼ 標品	精製倍率 * 1	活性収率 * 2	酵素収量	酵素析出温度
実施例 5	13.7倍	32.1%	92.1mg	2~5℃
実施例 6	120.0倍	1.4%	1.24mg	2~5℃

$$* 1 \text{ 精製倍率} = \frac{\text{精製酵素の比活性}}{\text{粗酵素液の比活性}}$$

$$* 2 \text{ 収率} = \frac{\text{精製酵素の全活性}}{\text{粗酵素液の全活性}} \times 100$$

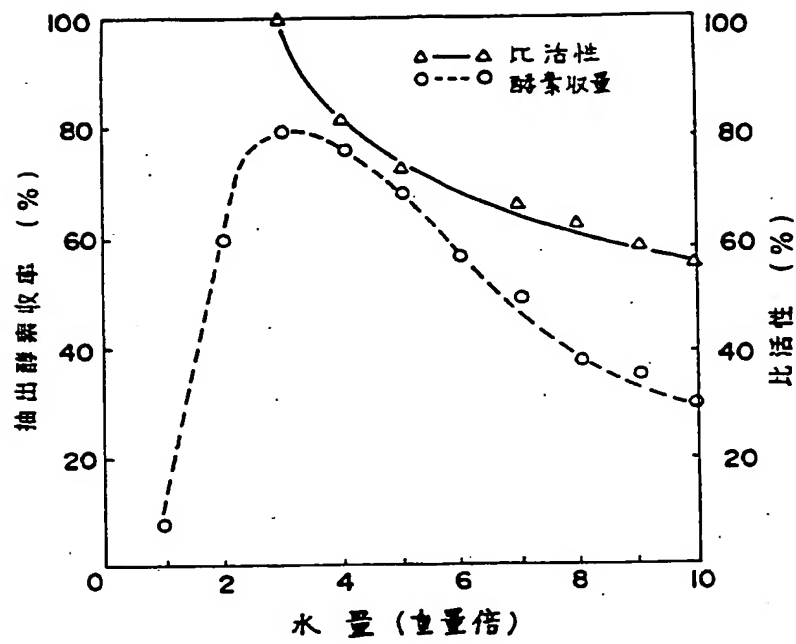
(効 果)

以上述べたように、本発明は、イネモミガラより水を使用してパーオキシダーゼを抽出し、得られた抽出液を簡単な操作によって、特にイソプロパノールを用いた場合、イソプロパノール濃度を30%から80%の範囲で、酵素蛋白を分画沈澱するという極めて簡単な操作によって、純化パーオキシダーゼを得るのであつて、従来の製造方法に比して遥かに安価にパーオキシダーゼを得ることができる。

図面の簡単な説明

第1図は、モミガラに対する抽出水量 (重量倍) と抽出された酵素の収率 (%) と比活性との関係を示した図、第2図はイソプロパノールの濃度とその濃度で沈澱する蛋白質収率及び沈澱中に存在するパーオキシダーゼの相対活性との関係を示した図である。

第1図



第2図

